

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570242

研究課題名(和文) 三次元培養によるヒト多能性幹細胞から小脳組織への分化誘導

研究課題名(英文) Self-organization of cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells

研究代表者

六車 恵子 (Muguruma, Keiko)

独立行政法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・専門職研究員

研究者番号：30209978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：緻密な運動制御に重要な小脳神経の変性は、重篤な運動失調を生じる。根治療法のない脊髄小脳変性症を視野に、ヒトES・iPS細胞から小脳神経細胞の分化誘導を行い、ヒト由来細胞の疾患モデル化による疾患の原因究明や創薬へ結びつける。3次元浮遊培養による分化誘導で培養初期のFgf2の添加は、培地含有のインスリンとの協調作用により、菱脳峡オーガナイザーを形成し、自律的な小脳神経細胞、特にプルキンエ細胞や顆粒細胞などの効率的な分化を誘導した。培養途中でのFgf19およびCXCL12の添加は極性を伴った小脳組織の構築に寄与した。本研究によって、ヒトES・iPS細胞から小脳神経細胞の誘導と組織構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：Purkinje cells are the sole output neurons of the cerebellar cortex and their dysfunction causes severe ataxia. We found that both Purkinje cells and granule cells could be effectively generated from human pluripotent stem (ES and iPS) cells by recapitulating the self-inductive signaling microenvironments of the isthmic organizer. The cerebellar neuroepithelium (NE), formed in response to the combination of Fgf2 and insulin, differentiated into electrophysiologically functional Purkinje cells. The addition of Fgf19 and CXCL12 promotes the generation a continuous cerebellar plate NE and a three-layer cytoarchitecture similar to the embryonic cerebellum. Thus, human pluripotent stem cells-derived cerebellar progenitors exhibit substantial self-organizing potential for generating a polarized structure reminiscent of the early human cerebellum.

研究分野：神経発生

キーワード：小脳 ヒト多能性幹細胞 神経分化 3次元培養 自己組織化

1. 研究開始当初の背景

(1) 運動失調が主症状の神経疾患である脊髄小脳変性症は、その多くが原因不明の孤発性である。原因遺伝子の明らかな遺伝性ものも含め、発症機序が不明なため、根治療法はまだない。特に小脳皮質唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞の変性・脱落は重篤な小脳性運動失調を招く。原因の解明・根治療法の開発・創薬研究を目指した実験動物レベルの研究は多いが、ヒト由来細胞による疾患モデルの開発が望まれている。

(2) 研究代表者は、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) から効率よく、且つ選択的に小脳顆粒細胞およびプルキンエ細胞を分化誘導する事に成功している (Su et al., Dev. Biol., 2006, Muguruma et al., Nature Neurosci, 2010)。高効率な分化誘導は、小脳の発生過程を試験管内で再現する事によって初めて可能となり、生体と同様の発生の過程を経て得られた ES 細胞由来のプルキンエ細胞は、電気生理学的解析や組織形態学的解析から、本来の細胞と遜色のない機能的特徴を備えている事が分かった。

2. 研究の目的

(1) 先行研究としてマウス ES 細胞で確立した小脳プルキンエ細胞の 3 次元浮遊培養法を用いた分化誘導法を、ヒト多能性幹細胞に応用し、小脳神経細胞の効率的な分化誘導と神経ネットワークなどの機能性を持ち合わせた小脳組織の作製方法の開発を行う。

(2) 開発した分化誘導方法のヒト iPS 細胞への応用を試みる。患者から提供された体細胞に由来する疾患特異的 iPS 細胞に活用する事により、病気の原因究明や創薬開発に活かす。ヒト由来細胞による疾患モデル化へと結びつける事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト多能性幹細胞のうち比較的扱いやすい ES 細胞を用いる。創薬や臨床応用を念頭に課題を遂行するので効率的な分化誘導方法である事を最大限追求する。これまでの研究から、発生過程の再現が出来れば、生体本来の機能を持つ細胞が効率よく得られると予想できる。試験管内で小脳の発生過程を再現するため、マウス ES 細胞からの分化誘導法と同様、培養液として無血清完全化学合成培地を用い、低タンパク質吸着仕様の 96 穴培養プレートに数千個/穴の割合で ES 細胞を播種し、神経前駆細胞からなる細胞凝集塊を作製する。小脳の発生に必須の菱脳峡オーガナイザーの形成を促すために、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF2) をはじめ神経管発生の時間軸に沿った関連因子の効果をスクリーニングする。解析は主に、組織学的、定量的遺伝子発現解析を用いる。

(2) 菱脳峡オーガナイザーの誘導によって小脳領域を含む中脳-後脳吻側部が形成されるので、ここからさらに小脳へと領域化を進める。具体的には背側化因子の添加、あるいは腹側化因子の阻害によって、神経管における背腹軸情報の制御をおこなう。これによって、ヒト多能性幹細胞から神経前駆細胞、さらには小脳細胞への領域化が行われる事となる。

(3) ヒト ES 由来プルキンエ細胞の純化ならびに細胞系譜追跡のために、プルキンエ細胞前駆細胞に特異的に発現する遺伝子座 (具体的には *KIRREL2*) にレポータータンパクをノックインした ES 細胞を樹立する。また、ヒト *KIRREL2* タンパクに対する抗体の作製も行う。純化した前駆細胞を長期培養する事により、プルキンエ細胞の成熟を促し、細胞としての形態学的、組織学的、電気生理学的機能を有するかを解析する。

(4) 3 次元構造を伴った小脳組織を作製するため、プルキンエ細胞以外的小脳を構築する細胞の分化誘導も行う。小脳はその構成細胞が異なる二つの領域から生み出されるため (菱脳唇と脳室帯) 組織としての小脳を作製するためにはこの二つの領域を同時に誘導する必要がある。しかしながら、マウス ES 細胞からの分化誘導法では、プルキンエ細胞が生み出される脳室帯と、顆粒細胞が生み出される菱脳唇を同じ方法で同時に誘導する事は出来なかった。本課題ではヒト ES 細胞を用い、これら二つの領域を同時に誘導するために必要な因子の探索を行い、層構造を伴った立体的な小脳組織の構築を目指す。

(5) 上記 (1~4) で得られた方法をヒト iPS 細胞へ活用し、疾患特異的 iPS 細胞からのプルキンエ細胞および小脳組織の分化誘導を行う。

4. 研究成果

(1) ROCK 阻害剤 (Y-27632) と TGF- β 阻害剤 (SB431542) を添加する事で、完全化学合成培地によって、ヒト ES 細胞から神経前駆細胞へと効率的に分化させる事が出来た。培養開始初期に添加した FGF2 は、培地に含まれるインスリンと協調的に作用し、菱脳峡オーガナイザーの形成を促した。細胞特異的マーカー分子の発現解析などから、オーガナイザーの形成 (*Fgf8*, *Wnt1*, *En2* の発現) に引き続き、小脳の発生過程が再現されたことがわかった (*Kirrel2*, *Ptf1a*, *Lhx1/5*, *SKOR2*, *Olig2* などの発現)。ヒト ES 細胞においても、オーガナイザーが形成されると、自律的に小脳神経細胞へと分化誘導が進む事が明らかとなった。

(2) Zinc-finger nuclease (ZFN) を用い、プルキンエ細胞前駆細胞特異的に発現する

Kirrel2 遺伝子座にレポータータンパクを挿入した ES 細胞の樹立を行った。Kirrel2 に対する抗体の作製を試みていたところ、市販抗体で特異性に良好なものを得ることができた。レポータータンパクの発現、あるいは Kirrel2 抗体を活用して、前駆細胞の純化を行ったところ、分化効率は神経前駆細胞中の約 3 割に達し、純化した前駆細胞のほぼ 9 割が成熟プルキンエ細胞へと分化する事が分かった。

(3) 純化したプルキンエ前駆細胞は、それ単独では長期生存が困難で、形態学的にも機能的にも成熟する事が難しい。そこで、プルキンエ前駆細胞からの成熟には、マウス小脳菱脳層由来の顆粒細胞との共培養系を利用した。ヒト ES 細胞由来プルキンエ細胞は形態学的(大きな細胞体、特徴的な樹状突起の伸展、樹状突起スパインの存在など)、組織学的(GRID2, L7/PCP2, Calbindin など)にもヒト生体内のプルキンエ細胞とほぼ同様の特徴を示した。電気生理学的特徴はマウスやラット小脳のプルキンエ細胞とほぼ同じであることがわかった(自発的な繰り返し発火パターン、興奮性入力を受容体選択性)。ヒト由来のプルキンエ細胞を用いた電気生理学的解析は、本研究が世界に先駆けての報告となった。

(4) 上記で確立した自己組織的な分化誘導法では、プルキンエ細胞が生み出される脳室帯に由来するその他の細胞として、ゴルジ細胞が誘導された。また同時に、菱脳層由来の顆粒細胞や深部小脳核細胞が分化誘導される事も確認できた。

(5) 複数種類の小脳細胞が同時に分化誘導できたため、組織構造の構築を可能にする方法を検討したところ、FGF19 と CXCL12 を培養途中で添加することによって、プルキンエ細胞前駆細胞と顆粒細胞前駆細胞から成る、妊娠初期の小脳組織に相当する層構造が形成されることがわかった。

(6) 本課題で見いだした分化誘導法を健常者由来のヒト iPS 細胞に適用したところ、プルキンエ細胞の分化誘導が可能であった。また、一部の脊髄小脳変性症の型(SCA6 など)由来の iPS 細胞からもプルキンエ細胞の分化誘導に成功した。

(7) 以上の通り、完全化学合成培地を用いた 3 次元浮遊培養法によってヒト多能性幹細胞から小脳神経細胞が分化誘導された。本誘導法が、ヒト iPS 細胞に活用できる事も確認できた。また、発生初期の小脳組織の構築も可能な培養方法を開発する事が出来た。

<引用文献>

Su, HL, Muguruma K, 以下 4 名, Dev.

Biol., 290, 287-296 (2006).

Muguruma, K. et al., Nature Neurosci., 13(10), 1171-1180 (2010).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Muguruma K., Nishiyama A., Kawakami H., Hashimoto K., Sasai Y., Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. Cell Reports 10, 537-550 (2015) (査読有) <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.051>

六車 恵子 ヒト多能性幹細胞の自己組織的分化による小脳組織の構築 (査読無)細胞工学、34、ページ未定

[学会発表]発表確定済み(計 3 件)

Muguruma K., Generation of cerebellar Purkinje cells from human pluripotent stem cells. Gordon Research Conference, Lucca, Italy, 2015/5/31~6/5

Muguruma K., Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. International Society for Stem Cell Research, Stockholm, Sweden, 2015/6/24~6/27

六車 恵子、西山 あやか、川上 秀史、橋本 浩一、笹井 芳樹 ヒト多能性幹細胞の 3 次元培養による極性を伴った小脳組織の自己組織的な形成 日本神経科学大会 兵庫県神戸市、2015/7/28~7/31

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 小脳前駆組織の製造方法

発明者: 笹井 芳樹、六車 恵子

権利者: 理化学研究所

種類: 特許

番号: 特願 2014-182758

出願年月日: 2014 年 09 月 08 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

プレス発表

題目：ヒトES細胞から小脳の神経組織への分化誘導に成功-脳神経系疾患に対する発症原因の究明や治療法開発などに期待-

発表者氏名：六車 恵子

発表主体：理化学研究所

発表日：2015年1月28日

報道等

報道時期：2015年1月30日

毎日新聞、日刊工業新聞、読売新聞、東京新聞、産経新聞、朝日新聞、中日新聞、日本海新聞、福島民報、北日本新聞、伊勢新聞、中国新聞、大阪日日新聞、神戸新聞、山陰中央新報

関西テレビ、NHK(TV)

BioWorld, Science Daily(海外web)

産経WEST 2015年2月6日(国内web)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

六車 恵子 (MUGURUMA Keiko)

理化学研究所 多細胞システム形成研究センター 専門職研究員

研究者番号：30209978

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：